

FR00 / 730

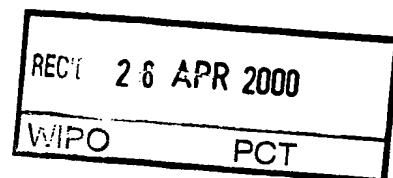


09/937103

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE



Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **12 AVR. 2000**

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Martine PLANCHE'.

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA RÈGLE
17.1.a) OU b)

INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE	SIEGE 26 bis, rue de Saint Petersbourg 75800 PARIS Cedex 08 Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30
---	--

This page blank (uspto)



26 bis, rue de Saint Petersbourg
75200 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télecopie : 01 42 93 59 30

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI

cerfa
N° 55 -1328

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télecopie

Cet envoi est à remplir à l'encre noire en lettres capitales.

Réserve à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **23 MARS 1999**

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **99 03765**

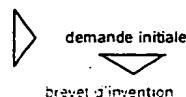
DEPARTEMENT DE DÉPÔT **L-1**

DATE DE DÉPÔT **23 MARS 1999**

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

brevet d'invention demande divisionnaire

certificat d'utilité transformation d'une demande de brevet européen



Établissement du rapport de recherche

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance oui non

Recherche de l'invention (200 caractères maximum)

UTILISATION DE TREHALOSE POUR STABILISER UN VACCIN LIQUIDE

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN 3 4 9 5 0 5 3 7 0

code APE-NAF 2 4 4 C

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

PASTEUR MERIEUX Sérum et Vaccins

Forme juridique

S.A.

Nationalité (s) FRANCAISE

Adresse (s) complète (s)

58, avenue Leclerc
69007 LYON

Pays

FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs oui non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES requise pour la 1ère fois requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire)

KERNEIS Danièle

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

D. GIRAUD

THIS PAGE BLANK (USPTO)

UTILISATION DE TREHALOSE POUR STABILISER UN VACCIN LIQUIDE

L'invention est relative au domaine des vaccins. Plus particulièrement, l'invention concerne les compositions vaccinales liquides comprenant, parmi leurs antigènes, au moins un polysaccharide lié à une protéine porteuse.

On connaît, dans l'art antérieur, de telles compositions vaccinales, dont certains antigènes, pour être immunogènes, doivent être liés à des protéines porteuses. C'est notamment le cas des compositions destinées à la vaccination contre les infections provoquées par la bactérie *Haemophilus influenzae* de type b, qui comprennent, à titre d'antigène vaccinal, le polysaccharide capsulaire de la bactérie ou Polyribosyrlribitol Phosphate (PRP) couplé à l'anatoxine tétanique T. De telles compositions vaccinales ont tendance à perdre de leur immunogénicité, et donc de leur efficacité au cours du temps.

Pour pallier cet inconvénient, la solution généralement proposée dans l'art antérieur est la lyophilisation. Cette solution, satisfaisante d'un point de vue du résultat obtenu en matière de conservation de l'immunogénicité, présente cependant l'inconvénient d'alourdir le procédé de fabrication, et donc d'en accroître le coût. En outre, au moment de l'administration du vaccin, il est nécessaire d'effectuer une opération supplémentaire de reprise du lyophilisat par un liquide stérile, ce qui d'une part représente une contrainte supplémentaire pour le praticien et d'autre part, comporte, comme toute manipulation, le risque d'être mal effectuée. Il est donc souhaitable de trouver une autre solution au problème de la perte d'immunogénicité au cours du temps des antigènes polysaccharidiques liés à une protéine porteuse lorsqu'ils sont présents dans une composition vaccinale liquide.

A cette fin, l'invention propose une composition vaccinale liquide comprenant au moins un antigène constitué par un polysaccharide lié à une protéine porteuse, caractérisé en ce qu'elle comprend en outre du tréhalose.

Ainsi, on obtient une composition vaccinale qui, bien que liquide, conserve son caractère immunogène au cours du temps, même lorsqu'elle est conservée à température ambiante.

35

La présente invention a également pour objet un procédé de stabilisation d'une composition vaccinale liquide comprenant au moins un antigène constitué par un polysaccharide lié à une protéine porteuse, caractérisée en ce qu'il consiste à ajouter à la composition vaccinale du tréhalose.

Le procédé selon l'invention présente l'avantage d'être simple et rapide, ce qui en fait un procédé de choix pour un industriel.

De nombreux autres avantages de la présente invention apparaîtront à la 5 lecture de la description détaillée qui suit.

La composition vaccinale selon l'invention peut être une composition monovalente, c'est-à-dire qu'elle est destinée à la protection contre une seule maladie, ou plurivalente, c'est-à-dire qu'elle est destinée à protéger l'individu à 10 qui elle a été administrée, contre plusieurs maladies. Dans tous les cas, au moins une des valences vaccinales est représentée par un antigène polysaccharidique lié à une protéine porteuse. Parmi les antigènes polysaccharidiques susceptibles d'entrer dans la composition d'un vaccin et d'être stabilisés selon l'invention, on peut citer les polysaccharides présents 15 dans les capsules de bactéries, les polysaccharides présents dans les parois de bactéries Gram négatif ou encore les polysaccharides présents dans les parois de champignons. Ainsi, il est possible d'utiliser les polysaccharides rencontrés dans les microorganismes suivants : Pseudomonas (par exemple *P. aeruginosa*), *Staphylococcus*, *Streptococcus* (par exemple *S. pneumoniae*), 20 *Klebsiella* (par exemple *K. pneumonia*), *Salmonella* (par exemple *S. typhi* et *S. paratyphi*), *Escherichia coli*, *Neisseria* (par exemple *N. meningitidis*), *Shigella* (par exemple *S. dysenteriae*, *somnei* ou *flexneri*), *Haemophilus* (par exemple *H. influenzae* de type b), *Moraxella*, *Vibrio cholerae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida*, *Cryptococcus neoformans* ainsi que *Hansenula*.

25

La présente invention a montré tout son intérêt pour des compositions vaccinales comprenant le polysaccharide capsulaire de *Haemophilus influenzae* type b ou Polyribosylribitol Phosphate.

30

Les polysaccharides utilisés généralement en tant qu'antigènes vaccinaux présentent généralement la caractéristique d'être T-indépendants, c'est-à-dire notamment que la mémoire du système immunitaire vis-à-vis de tels antigènes est faible et que ces polysaccharides ne sont généralement pas immunogènes chez les jeunes enfants. Afin de les rendre T-dépendants, il est 35 usuel de les associer à des protéines porteuses (par protéine, au sens de la présente invention, on inclut également les peptides ou polypeptides) afin d'obtenir un conjugué polysaccharide-protéine porteuse. Ces protéines sont notamment celles utilisées habituellement dans le domaine des vaccins :

anatoxine diptérique, anatoxine tétanique, forme mutante non-toxique CRM₁₉₇ de l'anatoxine diptérique, protéine de membrane externe de type 1 (OMP1) de *Neisseria meningitidis*, ainsi que tout peptide ou polypeptide natif ou de synthèse susceptible de remplir la même fonction, par exemple les peptides 5 décrits dans la demande de brevet WO98/31393.

La liaison du polysaccharide à la protéine porteuse peut varier selon le polysaccharide et la protéine utilisée. Il s'agit généralement de liaison covalente, pouvant faire intervenir un bras espaceur. Selon le mode de liaison mis en 10 œuvre, l'antigène obtenu que l'on appelle généralement conjugué, est un antigène dans lequel le polysaccharide est lié à la protéine porteuse par une seule fonction chimique (conjugués de type soleil ou néoglycoconjugués) ou par plusieurs fonctions (conjugués de type râteau ou pelote).

15 La composition vaccinale selon l'invention pouvant être plurivalente, il est possible d'ajouter à l'antigène constitué par le conjugué polysaccharide-protéine porteuse une ou plusieurs autres valences constituées également par un conjugué polysaccharide-protéine porteuse, ou par tout autre antigène de type différent. Parmi les autres valences susceptibles d'entrer dans la composition 20 vaccinale selon l'invention, on peut citer notamment : la coqueluche, la polio, la diphtérie, le téтанos, l'hépatite (A,B,C...), la varicelle, les oreillons, la rougeole, la Dengue, l'encéphalite japonaise, la fièvre jaune, la rubéole, la grippe, la méningite, les pneumonies, ...etc.

25 La composition vaccinale selon l'invention peut comprendre en outre tous les composants présents habituellement dans un vaccin : tampon ou sérum physiologique, conservateur, ainsi qu'un ou plusieurs adjuvants.

30 Selon une caractéristique de l'invention, cette composition vaccinale comprend, en outre, du tréhalose en quantité suffisante pour permettre le maintien au cours du temps de l'immunogénicité de l'antigène constitué par le conjugué polysaccharidique.

35 Le tréhalose ou α -D-glucopyranosyl α -D-glucopyranoside est un disaccharide connu pour son action protectrice des protéines lorsqu'elles sont soumises à des températures élevées, notamment lors d'opérations de séchage ou lyophilisation. Selon l'enseignement du document US 4 891 319 son action

protectrice pourrait s'expliquer par une substitution des molécules d'eau par des molécules de tréhalose, les 2 composés comportant des fonctions OH.

Le tréhalose est également connu dans l'art antérieur comme protecteur
5 de cellules.

De façon surprenante et sans que cela puisse se déduire des propriétés connues du tréhalose, il a maintenant été trouvé que ce composé permettait de conserver l'immunogénicité de compositions vaccinales, même dans le cas où
10 celles-ci ne seraient pas soumises à une élévation de la température ou à un procédé de séchage.

Par contre, d'autres sucres testés connus pour avoir des propriétés proches du tréhalose, notamment le lactose, n'ont pas conduit à des résultats
15 satisfaisants.

Selon une caractéristique particulière de l'invention, on a remarqué qu'une quantité de tréhalose comprise entre 3 et 12 %, et de préférence 5, était satisfaisante pour résoudre le problème de stabilité de la composition vaccinale.
20 A cette concentration, aucune réaction de toxicité n'a été relevée.

Le tréhalose convenant aux fins de l'invention doit être un tréhalose de qualité pharmaceutique, sans qu'il soit cependant nécessaire qu'il présente un degré de pureté absolue. Le tréhalose fourni par la Société SIGMA sous la
25 référence T9531 convient parfaitement bien.

L'addition du tréhalose peut être effectuée au début du procédé de fabrication ; il peut également être ajouté dans la formulation à la fin du procédé, seul ou en mélange avec les autres excipients.

30

Les exemples qui suivent illustrent plus particulièrement un mode de réalisation de l'invention.

Exemple 1

35

On prépare 3 compositions vaccinales différentes en procédant de la manière suivante :

a- Fabrication de 4 solutions stock d'excipients

- solution de Tris Hydroxyl Amino Méthane 50 mM- saccharose 42.5 %

Composition pour 1 litre:

6.06 g Tris Hydroxyl Amino Méthane.

5 425 g saccharose

Eau PPI q.s.p.. 1 litre

- Solution de tréhalose à 20%

Composition pour 400 ml

10 Tréhalose: 80 g

Eau PPI q.s.p.. 400 ml

PH=7 +0.1 après ajustement avec une solution de soude 2.5N

- Solution de chlorure de sodium 2M

15 Composition pour 1 litre

Chlorure de sodium: 117 g

Eau PPI q.s.p.. 1 litre

- Solution de Tris Hydroxyl Amino Méthane 50 mM

20 Composition pour 1 litre

Tris Hydroxyl Amino Méthane: 6.06 g

HCl 5N: 8.54 ml

Eau PPI q.s.p.. 1 litre

25 b- Fabrication de 3 solutions d'excipients (A,B,C) à partir des 4 solutions stocks précédentes. Les volumes des solutions stocks utilisés sont indiqués dans le tableau ci dessous:

Solutions stock	Excipient 1	Excipient 2	Excipient 3
Solution Tris Hydroxyl Amino Méthane 50 mM, saccharose 42.5 %	72.6 ml	0	0
Solution tréhalose 20%	0	100ml	200 ml
Solution de chlorure de sodium 2M	0	19ml	0
Solution Tris Hydroxyl Amino Méthane 50 mM	0	72.6 ml	72.6 ml
Eau PPI	q.s.p.. 363 ml	q.s.p.. 363 ml	q.s.p.. 363 ml

30 c- Chaque solution d'excipient est stérilisée par filtration sur un filtre Millipack 60 de 0.22µm de seuil de coupure

d- Pour obtenir chacune des compositions vaccinales, on ajoute dans un flacon Schott de 500 ml stérilisé par autoclave, dans l'ordre : 290 ml de chacune des solutions d'excipients préparées puis 29.6 ml d'une composition contenant du PRP-T et du saccharose. Les flacons sont placés sous agitation 5 minutes à température ambiante puis 2 heures à 4°C.

e- Chaque composition est répartie dans des flacons peni en verre qui sont maintenus 6 mois à 25°C.

5 La composition finale de chaque formulation est résumée dans le tableau suivant :

	Composition A	Composition B	Composition C
PRP-T (µg de polyoside /ml)	20	20	20
Tris Hydroxyl Amino Méthane (mM)	10 mM	10 mM	10 mM
Saccharose (%)	8.5%	0.78%	0.78%
Tréhalose (%)	0%	5%	10%
NaCl (mM)	0	0.095 mM	0

Exemple 2

10 On dispose de 5 lots de 8 souris femelles OF 1, d'un poids de 22 à 24 grammes. Les souris sont réparties par lots de 8. Chaque lot est utilisé pour tester une des compositions vaccinales A, B, ou C obtenues selon l'exemple 1, une composition vaccinale servant de témoin négatif (comportant uniquement du PRP non conjugué) ainsi qu'une composition vaccinale servant de témoin 15 positif qui est constituée du vaccin Act-Hib™ commercialisé par la Société PASTEUR MERIEUX Sérum et Vaccins.

On administre à chaque souris, par voie sous-cutanée, 0,5 ml de la composition vaccinale à tester correspondant à 2,5 µg de polyoside. Chaque souris reçoit 20 une injection à J0 et une injection de rappel à J14.
Le sérum de chaque souris est prélevé à J0, J14 et J21.

Exemple 3

25 Les sérums prélevés sont titrés par Radio Immuno-Assay. Les résultats obtenus sont exploités de la manière suivante :

- La moyenne géométrique est calculée à partir du titre des 8 sera.
- Le % de souris répondeuses (sérum ayant un titre >0.5) est déterminé.
- La différence des titres obtenue à J14 et J21 est calculée de manière à évaluer l'effet de l'injection de rappel.

Le produit est déclaré conforme lorsque les 3 conditions suivantes sont remplies :

- A J21, au moins 75 % des souris ont un titre ≥ 0.5 .
- La différence entre les titres obtenus à J14 et J21 est statistiquement significative.
- La différence de titre entre le produit testé et le témoin positif n'est pas statistiquement significative à J21.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

10

	GMT à J14	GMT à J21	Conformité du Produit
Témoin Négatif	< 0,09	0,05	-
Témoin Positif	< 0,1	1,3	+
Composition A	0,33	0,99	-
Composition B	0,13	1,6	+
Composition C	0,11	2,9	+

Ces résultats montrent que les compositions vaccinales selon l'invention conservent leur immunogénicité après stockage pendant 6 mois à 25°C.

15

Des tests effectués de la même façon sur des compositions stockées à 37°C, ont montré qu'une composition selon l'invention, comprenant 5 % de tréhalose, conservait son caractère immunogène même après 3 mois de stockage.

REVENDICATIONS

1. Composition vaccinale liquide comprenant au moins un antigène constitué
5 par un polysaccharide lié à une protéine porteuse, caractérisé en ce qu'elle comprend en outre du tréhalose.
2. Composition vaccinale selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit polysaccharide est le polysaccharide capsulaire de Haemophilus influenzae
10 type b ou Polyribosyribitol Phosphate.
3. Composition vaccinale selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit polysaccharide est un polysaccharide de Pneumocoque.
- 15 4. Composition vaccinale selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit polysaccharide est un polysaccharide de méningocoque.
5. Composition vaccinale selon une des revendications précédentes, caractérisée en ce que ladite protéine porteuse est l'anatoxine tétanique.
20
6. Composition vaccinale selon une des revendications précédentes, caractérisée en ce que ladite protéine porteuse est l'anatoxine diphtérique.
7. Composition vaccinale selon une des revendications précédentes,
25 caractérisée en ce que la quantité de tréhalose est comprise entre 3 et 12 % en masse.
8. Compositions vaccinales selon la revendication précédente, caractérisée en ce que la quantité de tréhalose est d'environ 5 %.
30
9. Procédé de stabilisation d'une composition vaccinale liquide comprenant au moins un antigène constitué par un polysaccharide lié à une protéine porteuse, caractérisée en ce qu'il consiste à ajouter à la composition vaccinale du tréhalose.
35
10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que la quantité de tréhalose à ajouter est comprise entre 3 et 12 % en masse.